

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-505591

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
A 0 1 N	1/02	A 0 1 N	1/02
A 2 3 L	3/42	A 2 3 L	3/42
// A 6 1 K	9/19	C 0 7 K	1/00
C 0 7 K	1/00	C 1 2 N	1/00
C 1 2 N	1/00		7/00
			Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-507868	(71) 出願人	クアドラント ホールディングス ケンブリッジ リミテッド
(86) (22) 出願日	平成7年(1995) 8月18日		イギリス国シービー2 2エスワイ ケンブリッジ, トランピントン マリス レーン (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 2月19日	(72) 発明者	コラコ, カミロ
(86) 国際出願番号	P C T / G B 9 5 / 0 1 9 6 7		イギリス国シービー2 2ジェイエヌ ケンブリッジ, トランピントン, フォスターウェイ 107
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 0 5 8 0 9	(74) 代理人	弁理士 浅村 皓 (外3名)
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 2月29日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 2 9 3, 1 5 7		
(32) 優先日	1994年8月19日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 乾燥中および以後の保存中の生物物質の安定化のための改良法とその組成物

(57) 【要約】

乾燥中の生物物質の安定性を向上させる方法は、該物質と該物質を安定化するのに十分な量の炭水化物賦形剤の水溶液または懸濁液に、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを加え、得られる組成物を乾燥させることよりなる。

【特許請求の範囲】

1. 乾燥中の生物物質の安定性を向上させる方法であって、該物質と該物質を安定化するのに十分な量の炭水化物賦形剤の水溶液または懸濁液に、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを加え、得られる組成物を乾燥させることよりなる上記方法。
2. 生物物質は、細胞下成分、細胞およびウイルスよりなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 生物物質は、遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する分子よりなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。
4. 生物物質は、薬剤、脂質、有機物、ペプチド、タンパク質、ホルモン、糖類、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子よりなる群から選択される、請求の範囲第3項に記載の方法。
5. タンパク質は、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインよりなる群から選択される、請求の範囲第4項に記載の方法。
6. 乾燥法は、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥よりなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。
7. 炭水化物は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの対応する糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。
8. 炭水化物は還元性である、請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 炭水化物は、グルコース、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースよりなる群から選択される、請求の範囲第8項に記載の方法。
10. 炭水化物は非還元性である、請求の範囲第7項に記載の方法。
11. 炭水化物は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体よりなる群から選択される、請求の範囲

第10項に記載の方法。

12. 炭水化物は、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第10項に記載の方法。

13. 炭水化物は、マルチトール（4-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O-β-D-ガラクトピラノシル-D-グルシトール）、イソマルツロース、パラチニット (palatinit) およびその構成異性体（GPS、α-D-グルコピラノシル-1→6-ソルビトールおよびGPM、α-D-グルコピラノシル-1→6-マンニトール）、イソマルツロース由来の糖アルコール（パラチノース (palatinose)）（6-α-D-グルコピラノシル-マンニトール、および6-α-D-グルコピラノシル-ソルビトール）、ショ糖およびその対応する糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第10項に記載の方法。

14. 炭水化物は生理学的に許容される、請求の範囲第7項に記載の方法。

15. インヒビターは競合的である、請求の範囲第1項に記載の方法。

16. インヒビターは、少なくとも1つの1次、2次、または3次アミン基を有する分子である、請求の範囲第15項に記載の方法。

17. インヒビターは非競合的である、請求の範囲第1項に記載の方法。

18. インヒビターは、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンB、4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体、4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体、3-オキソフェノキサジン誘導体、3-オキソフェノキサジンN-オキシド、アスコルビン酸トコフェロールホスフェートジエステル、およびこれらの塩よりなる群から選択される、請求の範囲第17項に記載の方法。

19. 乾燥法は凍結乾燥であり、インヒビターは競合的インヒビターである、請求の範囲第1項に記載の方法。

20. 乾燥法は凍結乾燥であり、インヒビターは非競合的インヒビターである、請求の範囲第1項に記載の方法。

21. 乾燥法は凍結乾燥以外の方法であり、インヒビターは競合的インヒビターである、請求の範囲第1項に記載の方法。

22. 乾燥法は凍結乾燥以外の方法であり、インヒビターは非競合的インヒビターである、請求の範囲第1項に記載の方法。

23. 生物物質の保存安定性を向上させる方法であつて、該物質の安定性を向上させるのに有効な量の炭水化物賦形剤を加え、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを加え、得られる組成物を乾燥し、組成物を保存することよりなる上記方法。

24. 生物物質は、細胞下成分、細胞およびウイルスよりなる群から選択される、請求の範囲第23項に記載の方法。

25. 生物物質は、遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する分子よりなる群から選択される、請求の範囲第23項に記載の方法。

26. 生物物質は、薬剤、脂質、有機物、タンパク質、ホルモン、糖類、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子よりなる群から選択される、請求の範囲第25項に記載の方法。

27. タンパク質は、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインよりなる群から選択される、請求の範囲第26項に記載の方法。

28. 乾燥法は、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥よりなる群から選択される、請求の範囲第23項に記載の方法。

29. 炭水化物は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第23項に記載の方法。

30. 炭水化物は還元性である、請求の範囲第29項に記載の方法。

31. 炭水化物は、グルコース、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースよりなる群から選択される、請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 炭水化物は非還元性である、請求の範囲第29項に記載の方法。

33. 炭水化物は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択される

ポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体よりなる群から選択される、請求の範囲第32項に記載の方法。

34. 炭水化物は、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第32項に記載の方法。

35. 炭水化物は、マルチトール（4-O- β -D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O- β -D-ガラクトピラノシル-D-グルシトール）、イソマルツロース、パラチニット (palatinit) およびその構成異性体（GPS、 α -D-グルコピラノシル-1 \rightarrow 6-ソルビトールおよびGPM、 α -D-グルコピラノシル-1 \rightarrow 6-マンニトール）、イソマルツロース由来の糖アルコール（パラチノース (palatinose)）（6- α -D-グルコピラノシル-マンニトール、および6- α -D-グルコピラノシル-ソルビトール）、ショ糖およびその対応する糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第32項に記載の方法。

36. 炭水化物は生理学的に許容される、請求の範囲第31項に記載の方法。

37. インヒビターは競合的である、請求の範囲第23項に記載の方法。

38. インヒビターは、少なくとも1つの1次、2次、または3次アミン基を有する分子である、請求の範囲第37項に記載の方法。

39. インヒビターは、少なくとも1つのアミノ酸残基、アミノ酸残基の混合物、またはアミノ酸残基よりなる短いペプチドよりなる群から選択される、請求の範囲第38項に記載の方法。

40. インヒビターは非競合的である、請求の範囲第23項に記載の方法。

41. インヒビターは、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンB、4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体、4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体、3-オキソフェノキサジン誘導体、3-オキソフェノキサジンN-オキシド、アスコルビン酸トコフェロールホスフェートジエステル、およびこれらの塩よりなる群から選択される、請求の範囲第40項に記載の方法。

42. 保存は0℃～80℃である、請求の範囲第23項に記載の方法。

43. 保存は0℃～65℃である、請求の範囲第23項に記載の方法。

44. 保存は10℃～60℃である、請求の範囲第23項に記載の方法。
45. 保存は20℃～50℃である、請求の範囲第23項に記載の方法。
46. 保存は周囲温度より高い温度である、請求の範囲第23項に記載の方法。
47. 乾燥した生物物質の保存安定性を向上させる方法であって、該物質、該物質の安定性を向上させるのに有効な量の炭水化物賦形剤を組合せ、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを加え、組成物を保存することよりなる上記方法。
48. 生物物質は、細胞下成分、細胞およびウイルスよりなる群から選択される、請求の範囲第47項に記載の方法。
49. 生物物質は、遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する分子よりなる群から選択される、請求の範囲第47項に記載の方法。
50. 生物物質は、薬剤、脂質、有機物、ペプチド、タンパク質、ホルモン、糖類、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子よりなる群から選択される、請求の範囲第49項に記載の方法。
51. タンパク質は、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインよりなる群から選択される、請求の範囲第50項に記載の方法。
52. 乾燥法は、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥よりなる群から選択される、請求の範囲第47項に記載の方法。
53. 炭水化物は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第47項に記載の方法。
54. 炭水化物は還元性である、請求の範囲第53項に記載の方法。
55. 炭水化物は、グルコース、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースよりなる群から選択される、請求の範囲第54項に記載の方法。
56. 炭水化物は非還元性である、請求の範囲第53項に記載の方法。

57. 炭水化物は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体よりなる群から選択される、請求の範囲第56項に記載の方法。

58. 炭水化物は、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第56項に記載の方法。

59. 炭水化物は、マルチトール（4-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O-β-D-ガラクトピラノシル-D-グルシトール）、イソマルツロース、パラチニット（palatinit）およびその構成異性体（GPS、α-D-グルコピラノシル-1→6-ソルビトールおよびGPM、α-D-グルコピラノシル-1→6-マンニトール）、イソマルツロース由来の糖アルコール（パラチノース（palatinose））（6-α-D-グルコピラノシル-マンニトール、および6-α-D-グルコピラノシル-ソルビトール）、ショ糖およびその対応する糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第56項に記載の方法。

60. 炭水化物は生理学的に許容される、請求の範囲第53項に記載の方法。

61. インヒビターは競合的である、請求の範囲第47項に記載の方法。

62. インヒビターは、少なくとも1つの1次、2次、または3次アミン基を有する分子である、請求の範囲第61項に記載の方法。

63. インヒビターは、少なくとも1つのアミノ酸残基、アミノ酸残基の混合物、またはアミノ酸残基よりなる短いペプチドよりなる群から選択される、請求の範囲第62項に記載の方法。

64. インヒビターは非競合的である、請求の範囲第47項に記載の方法。

65. インヒビターは、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンB、4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体、4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体、3-オキソフェノキサジン誘導体、3-オキソフェノキサジンN-オキシド、アスコルビン酸トコフェロールホスフェートジエステル、およびこれらの塩よりなる群から選択される、請求の範囲第64項に記載の方法。

66. 保存は0℃～80℃である、請求の範囲第47項に記載の方法。

67. 保存は0℃～65℃である、請求の範囲第47項に記載の方法。

68. 保存は10℃～60℃である、請求の範囲第47項に記載の方法。

69. 保存は20℃～50℃である、請求の範囲第47項に記載の方法。

70. 保存は周囲温度より高い温度である、請求の範囲第47項に記載の方法。

71. 少なくとも1つの生物物質、少なくとも1つの炭水化物、およびメイラード反応のインヒビターよりなる実質的に乾燥した組成物であって、炭水化物は該生物物質を安定化させるのに十分な量で存在し、インヒビターはアミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに十分な量で存在する、上記組成物。

72. 生物物質は、細胞下成分、細胞およびウイルスよりなる群から選択される、請求の範囲第71項に記載の組成物。

73. 生物物質は、遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する分子よりなる群から選択される、請求の範囲第71項に記載の組成物。

74. 生物物質は、薬剤、脂質、有機物、タンパク質、ペプチド、ホルモン、糖類、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子よりなる群から選択される、請求の範囲第73項に記載の組成物。

75. タンパク質は、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインよりなる群から選択される、請求の範囲第74項に記載の組成物。

76. 乾燥の組成物は、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥よりなる群から選択される、請求の範囲第71項に記載の組成物。

77. 炭水化物は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第71項に記載の組成物。

78. 炭水化物は還元性である、請求の範囲第77項に記載の組成物。

79. 炭水化物は、グルコース、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースよりなる群から選択される、請求の範囲第78項に

記載の組成物。

80. 炭水化物は非還元性である、請求の範囲第77項に記載の組成物。

81. 炭水化物は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体よりなる群から選択される、請求の範囲第80項に記載の組成物。

82. 炭水化物は、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第81項に記載の組成物。

83. 炭水化物は、マルチトール（4-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O-β-D-ガラクトピラノシル-D-グルシトール）、イソマルツロース、パラチニット (palatinit) およびその構成異性体（GPS、α-D-グルコピラノシル-1→6-ソルビトールおよびGPM、α-D-グルコピラノシル-1→6-マンニトール）、イソマルツロース由来の糖アルコール（パラチノース (palatinose)）（6-α-D-グルコピラノシル-マンニトール、および6-α-D-グルコピラノシル-ソルビトール）、ショ糖およびその対応する糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第81項に記載の組成物。

84. 炭水化物は生理学的に許容される、請求の範囲第77項に記載の組成物。

85. インヒビターは競合的である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

86. インヒビターは、少なくとも1つの1次、2次、または3次アミン基を有する分子である、請求の範囲第85項に記載の組成物。

87. インヒビターは、少なくとも1つのアミノ酸残基、アミノ酸残基の混合物、またはアミノ酸残基よりなる短いペプチドよりなる群から選択される、請求の範囲第86項に記載の組成物。

88. インヒビターは非競合的である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

89. インヒビターは、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンB、4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体、4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体、3-オキソフェノキサジン誘導体、3-オキソフェノキサジンN-オキシド、アスコルビン酸トコフェロールホスフェートジエステル、およびこれら

の塩よりなる群から選択される、請求の範囲第88項に記載の組成物。

90. 生物物質は0℃～80℃で保存安定である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

91. 生物物質は0℃～65℃で保存安定である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

92. 生物物質は10℃～60℃で保存安定である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

93. 生物物質は20℃～50℃で保存安定である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

94. 生物物質は周囲温度より高い温度で保存安定である、請求の範囲第71項に記載の組成物。

95. 少なくとも1つの炭水化物とメイラード反応のインヒビターよりなる、生物物質の保存安定性を向上させるための組成物であって、炭水化物は該生物物質を安定化させるのに十分な量で存在し、インヒビターはアミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに十分な量で存在する、上記組成物。

【発明の詳細な説明】

乾燥中および以後の保存中の生物物質の安定化のための改良法とその組成物

発明の分野

本発明は、乾燥中の生物物質の安定化と乾燥調製物の保存安定性を向上させるための方法に関する。安定化された生物物質の組成物もまた提供される。

発明の背景

保存安定性は、生物物質の乾燥調製物の最終目標である。加水分解反応における求核物質であり可塑剤である水は、反応性化学分子腫の分子運動性を増加させ、生物物質の水性調製物を乾燥調製物質より本質的に不安定にするため、水性調製物より乾燥調製物が好ましい。乾燥調製物におけるこの安定性の向上のために乾燥技術に焦点が当てられ、水分除去のための一般的な方法として凍結乾燥法が開発された。ピカール (Pikal) (1990a) *Biopharm.* 3:18-27; ピカール (Pikal) (1990b) *Biopharm.* 3:26-30; およびフランクス (Franks) (1990) *Cryoletters* 11:93-100。しかし、凍結乾燥は広く使用されているが、多くの凍結乾燥製品は、周囲温度においてまだ不安定である。カーペンターとクロウエ (Carpenter and Crowe) (1988) *Cryobiol.* 25:244-255; およびクオウエ (Crowe) ら (1990) *Cryobiol.* 27:219-231。凍結乾燥中の物理化学的事象の詳細な理論的解析により、安定化賦形剤としてのリオプロテクタント (lyoprotectant) に関する多くの文献が発表された。ピカール (Pikal) (1990b); カーペンターとクロウエ (Carpenter and Crowe) (1988); クロウエ (Crowe) ら (1990); およびレーバインとスレード (Levine and Slade) (1988) *Pure Appl. Chem.* 60:1841-4864。種々の炭化水素が凍結乾燥の安定性賦形剤として提唱されており、これらは、凍結乾燥工程で非晶質でガラス様の固体状態の産生を介して作用すると言われている。ピカール (Pikal) (1990b); フランクス (Franks) (1990); レーバインとスレード (Levine and Slade) (1988); およびフランクス (Franks) ら (1992) 米国特許第5,098,893号。しかし、種々の炭水化物賦形剤の最大に凍結濃縮した非凍結マトリックスの実験的

に測定され

たガラス転移温度の値が一定しないことにより証明されるように、凍結工程は変化が大きい。フランクス (Franks) (1990) ; レーバインとスレード (Levine and Slade) (1988) ; アブレット (Ablett) ら (1992) J. Chem. Soc. Faraday Trans. 88: 789-794 ; およびロス (Ross) (1993) Carbo. Res. 238: 39-48。

ガラス転移温度より高い温度への接触または凍結乾燥中の崩壊は、大きな活性低下を引き起こす。さらに、凍結は凍結乾燥中のタンパク質傷害の主要な原因であると考えられている。凍結乾燥中の活性の低下のために、周囲温度乾燥の技術が最近注目されている。これは凍結工程を不要とするのみでなく、乾燥中の水の除去に関してより急速でありエネルギー効率が高い。クロウエ (Crowe) ら (1990) ; ローザー (Roser) (1991) Biopharm. 4: 47-53 ; ローザーとコラコ (Roser and Colaco) (1993) New Scientist 138: 24-28 ; ブレークリー (Blakely) ら (1990) The Lancet 336: 854-55 ; コラコ (Colaco) ら (1990) Biotech. Intl. pp. 345-350、センチュリープレス (Century Press)、ロンドン ; コラコ (Colaco) ら (1992) Biotech. 10: 1007-1011 ; フランクス (Franks) (1991) Biopharm. 14: 38-55 ; フランクスとハットレイ (Franks and Hatley) (1993) 「酵素の安定性と安定化」 ("Stability and stabilization of enzymes")、ファン・デン・ツイール (van den Tweel) ら編、エルセビア (Elsevier)、アムステルダム (1993) pp. 45-54 ; およびフランクス (Franks) (1994) Bio/Tech. 12: 253-256 ; ローザー (Roser) 米国特許第4, 891, 319号 ; およびローザー (Roser) ら (1991) WO91/18091。

前述のおよび以後の本明細書に示すすべての文献は、参考のため本明細書に引用される。

乾燥した生物物質の安定化、特に周囲温度またはそれより高温での安定化は、

まだ未解決である。炭水化物であるトレハロース (α -D-グルコピラノシル- α -D-グルコピラノシド) は、乾燥タンパク質および他の生物物質の周囲温度またはそれより高温で長期間寿命を延ばすのに特異的に強力であることがわかつ

ている。安定性は、再水和後の生物活性の回復により評価される。ローザー (Roser) (1991) ; ローザーとコラコ (Roser and Colaco) (1993) ; ブレークリー (Blakely) ら (1990) ; コラコ (Colaco) ら (1990) ; コラコ (Colaco) ら (1992) ; カーペンターとクロウエ (Carpenter and Crowe) (1988) *Cryobiol.* 25: 459-47。トレハロースがタンパク質安定性を与えるのと同じ条件下で他の糖、多価アルコールおよび少糖類を検討した結果、この安定性の程度はトレハロースに特異的であることがわかった。しかし、これらの賦形剤のいくつかは、乾燥工程中の傷害から生物物質を保護し高温に対してより限定された耐性を与えるという意味で、部分的に防御性であった。クロウエ (Crowe) ら (1990) ; ローザー (Roser) (1991) ; コラコ (Colaco) ら (1990) ; クロウエ (Crowe) ら (1987) ; カーペンター (Carpenter) ら (1987) ; およびカーペンターとクロウエ (Carpenter and Crowe) (1988)。

トレハロースが生物分子を安定化させる分子的機序については、2つの仮説が提唱されている。クレッグ (Clegg) (1985)、「膜、代謝および乾燥生物」(Membranes, metabolism and dry organisms)、リオポルド (Leopold) 編、コーネル大学出版 (Cornell Univ. Press)、イタカ (Ithaca)、ニューヨーク、p p. 169-187 ; バーケ (Burke) (1985)「膜、代謝および乾燥生物」(Membranes, metabolism and dry organisms)、リオポルド (Leopold) 編、コーネル大学出版 (Cornell Univ. Press)、イタカ (Ithaca)、ニューヨーク、p p. 358-363 ; グリーンとアングル (Green and Angell) (1989) *J. Phys. Chem.* 93: 2280-2882 ; レーバインとスレード (Levine and Slade) (1992) *Biopharm.* 5: 36-40 ; およびクロウエ (Crowe) ら (1990) *Biopharm.* 6: 28-37。水置換理論では、トレハロースはポリオールであるため、多くの外部水素結合を形

成して、生物物質に水素結合してその分子構造を維持している基本的な構造水分子を置換すると主張している。クレッグ (Clegg) (1985) ; およびクロウエ (Crowe) ら (1993) 。ガラス状態理論では、乾燥していくトレハロース溶液でガラスが転移すると、非晶質の連続相となり、分子運動 (従って、分解的分子反応) が

動力学的に無視できるものとなると主張する。バーケ (Burke) (1985) ; グリーンとアングル (Green and Angell) (1989) ; およびレーバインとスレード (Levine and Slade) (1992) 。これまでに得られた結果および本明細書に記載の結果は、いずれの仮説もトレハロースの作用機序の単一の説明としては充分ではないことを示す。

水置換理論では、ポリロールとしてトレハロース以外の糖も安定化賦形剤として有効なはずであり、もし水酸基の特異的な空間的組合せが決定的に重要な特徴的なものであるなら、グルコースもトレハロースと同様に有効なはずであることを示唆する。しかし、これまでに得られた結果および本明細書に記載の結果は、ポリロールであるグルコースは、試験した多くの糖の中で最も有効でないものの1つであり (表1) 、トレハロースと同様の有効性を有するものは無かった (図1および表1) 。さらに、水置換から予想されるように分子的に水の類似物が重要であるなら、シロイノシトール (scylloinositol) (そのすべての水酸基がアキシアルである) が理論的に最も有効な炭水化物であるが、実際には最も有効性が低かった。すなわち、水置換理論は、トレハロースの作用機序の完全な説明にはならない。

同様に、ガラス状態理論だけでは、トレハロースが与える安定性を説明することはできない。前記の高温保存安定性データでは、水分含量が2.6~3.6%までトレハロース中で乾燥される試料のガラス転移温度は、示差走査熱量測定ではすべて37℃未満であった。すなわち、そのガラス転移温度よりはるか上で安定性が持続し、ガラス状態は他の系において重要であるが、一般的な考え方 (フランクス (Franks) ら、(1992) ; およびフランクス (Franks) (1994)) とは異なり、これはトレハロース中の生物物質の長期の高温安定性の原因で

はないようである。

現在の考え方では、タンパク質の安定性はほとんどすべてガラス転移温度に依存するが、糖の存在下でタンパク質の安定性の低下に寄与するいくつかの可能性のある反応が提唱されている。フランクス (Franks) (1994)。これらの可能性のある反応は解析されておらず、タンパク質を不安定化させる影響は、あっても非常に小さいと考えられている。フランクス (Franks) ら、(1994) ;

およびエーカーズとナイル (Akers and Nail) (1994) Pharm. Tech. 18:26-36。

発明の要約

本発明は、乾燥中の生物物質の安定性を向上させる方法、およびそこから得られる乾燥組成物に関する。1つの方法では、乾燥された生物物質を安定化するのに有効な量の炭水化物賦形剤の存在下で、かつアミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターの存在下で、生物物質を乾燥させる。他の方法では、生物物質を安定化するのに十分な量の炭水化物賦形剤の存在下で、かつアミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに十分な量のメイラード反応のインヒビターの存在下で、生物物質を保存することにより、乾燥された生物物質の保存安定性を向上させる。生物物質、炭水化物およびのメイラード反応のインヒビターの組成物も本発明に包含される。

図面の簡単な説明

図1。制限酵素 Pst I に関する加速エージング試験。

図2。加速エージングについて試験した試料の非酵素的褐色化。

図3。メイラード反応の模式図。

図4。フルクトースとグルコースの存在下で乾燥したアルカリ性ホスファターゼの褐色化。

図5。フルクトースとグルコースの存在下で乾燥したグルカゴンの HPLC 分析。

図6。モデル賦形剤中の化学反応におよぼす残存水分含量の影響。

図7。グルコースと増加する濃度のリジン中の乾燥と保存時のアルカリ性ホスファターゼの活性。

発明の詳細な説明

炭水化物賦形剤の存在下での乾燥タンパク質調製物の安定化に関する従来の研究は、安定化賦形剤が構造水を置換するか、および／または乾燥状態で非晶質またはガラス様固体マトリックスを与える安定化賦形剤の能力を強調してきた。これらの研究は、乾燥工程および乾燥後の保存工程中の化学反応の影響や性質を考

慮していない。本明細書の例に示されるように、これらの反応（乾燥中に始まる場合もある）は保存中に著しく増強される。これらの例は、メイラード反応が、炭水化物賦形剤の存在下で乾燥中および乾燥された生物物質の保存中に起きる主反応であることを示している。本方法および本明細書に記載の調製物は、保存中のメイラード反応を防止し、従って保存され乾燥された生物物質の寿命を延長させる。

メイラード反応は、反応性カルボニルとアミノ基が可逆的に自発的に縮合して開始されてシッフ塩基を形成する、カスケード化学反応である。シッフ塩基を形成するための初期の縮合の活性化エネルギーは、10～15 kcal のオーダーであり、水の存在下で可逆的であり、平衡は水環境中の反応物に大きく偏っている。レイノルズ (Reynolds) (1965) *Adv. Food Res.* 14: 167-283; フィノ (Finot) ら、(1990) 「食品加工におけるメイラード反応、ヒトの栄養と生理」 (Maillard Reaction in Food Processing. Human Nutrition and Physiology)、バークハウザー (Birkhauser)、バーゼル (Basel) ; およびレンドルとシュライチャー (Lendl and Schleicher) (1990) *Ang. Chem.* 28: 565-594。メイラード反応の成分の模式図を図3に示す。シッフ塩基の形成は、関与するタンパク質が架橋されて褐色のメラノイド色差が生成する連続的な反応のカスケードである。シッフ塩基の以後の自然のアマドリ (Amadori) またはヘインズ (Heyns) 転位は不可逆的であり、一連の複雑な反応を開始して、最終的に褐色のメラノイジン色素が生成し、関与するタンパク質の断片化と架橋が起きる。食品工業においては、メイラード反応は、特に

保存中の乾燥食品の品質劣化の原因の1つであるため、広く研究されている。これは、タンパク質と糖を有する食品の冷蔵保存に観察される。メイラード反応の平衡は、水の喪失によりシッフ塩基の生成に傾き、以後の多くの反応は水の活性の小さいところで加速されるため、乾燥食品には特に問題である。レンドルとシュライチャー (Lendl and Schleicher) (1990) ; ヌルステン (Nursten) (1986)、「食品の濃縮と乾燥中の乾燥食品におけるメイラード褐色化反応」 (Maillard browning reactions in dried foods in concentration and drying of foodstuffs)、マカーシー (McCarthy) 編、エスセビア・アプライド・サイエンス

(Elsevier Applied Science)、ロンドン。

本発明は、乾燥と保存中の生物物質の安定性を向上させるための方法と、保存安定性の向上したその乾燥組成物を包含する。本方法と組成物において、単一の型も使用できるが、2つ以上の炭水化物、2つ以上の生物物質および2つ以上のメイラード反応のインヒビターが存在してもよい。これらの化合物の有効量の測定は、当業者の技術の範囲内である。

生物物質は天然起源または化学合成から得られる。典型的には生物物質は、生物活性を有するか、または生物学的作用を及ぼすことができる。しかし、中間体または活性化合物と中間体の組合せも包含される。同様に、炭水化物の調製物および生物物質が取り込まれるメイラード反応のインヒビターは、本発明に包含される。生物物質は当該分野で公知の任意のものであり、細胞下成分、細胞、ウイルス、および遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する（ただしこれらに限定されない）分子があるが、これらに限定されない。このような分子には、薬剤、脂質、有機物、ペプチド、タンパク質、ホルモン（ペプチド、ステロイドおよびコルチコステロイド）、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子があるが、これらに限定されない。適当なタンパク質には、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインがあるが、これらに限定されない。有機物には、アミノ、イミノおよびグアニジノ基を有する薬学的活性の化合物があ

るが、これらに限定されない。

乾燥の方法は、当業者に公知の任意の方法であり、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥があるが、これらに限定されない。凍結乾燥の場合、試料を典型的には -70°C ～ -30°C に凍結し、コンデンサー温度 -50 ～ -80°C で乾燥するが、任意の適当な温度を使用することができる。凍結は当業者に公知の任意の方法で行われ、液体窒素への浸漬、 -4°C ～ -80°C のフリーザーに入れる、およびドライアイスとアルコール凍結浴に入れる方法があるが、これらに限定されない。周囲温度または高温での乾燥の場合は、凍結温度より高い任意の温度が使用できるが、ただし生物物質が変性

するほど高い温度ではない。好ましくは温度は 80°C 未満であり、より好ましくは 65°C 未満であり、最も好ましくは 20 ～ 50°C である。好ましくは、温度は周囲温度～ 50°C の範囲である。噴霧乾燥の場合は、温度範囲は 250°C 未満であり、より好ましくは 150 ～ 220°C の範囲であり、最も好ましくは 180 ～ 200°C の範囲である。

本明細書の保存または乾燥に関して、周囲温度または「室温」とは一般的に約 20°C であり、高温とは凍結する温度より高い温度である。「周囲温度より高い」温度とは、 20°C より高い温度である。

本明細書において、「炭水化物」という用語は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの対応する糖アルコール、ポリヒドロキシ化合物（例えば、炭水化物誘導体および化学修飾炭水化物）、ヒドロキシエチルデンプンおよび糖コポリマー（フィコール）があるが、これらに限定されない。炭水化物のD型およびL型ともに使用することができる。生物物質が薬物調製物とともに使用される時、選択される炭水化物は生物学的に許容されるものである。炭水化物は非還元性または還元性でもよい。本明細書の例に記載されるように、驚くべきことに、非還元性の炭水化物は、乾燥組成物中で保存すると加水分解して還元性炭水化物を生成し、そこに保存されている物質とともにシッフ塩基を形成することが見いだされた。この縮合により系を可塑化する水が生成し、化学物質の運動性が増加し、従っ

て分解性反応（メイラード反応を含む）の速度が上昇する。従って、本発明は非還元性炭水化物に特に有用である。

本発明の使用に適した還元性炭水化物は、当業者に公知のものであり、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースがあるが、これらに限定されない。

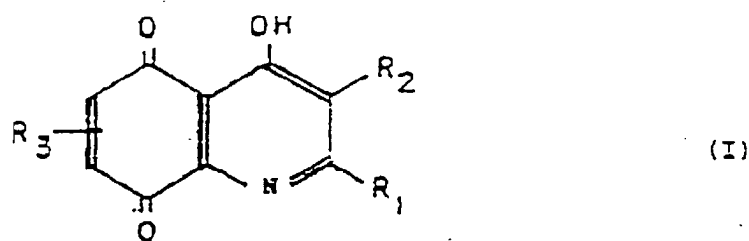
非還元性炭水化物には、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体があるが、これらに限定されない。他の有用な炭水化物には、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールがある。糖アルコール配糖体は、好ましくはモノ配糖体、特に二糖類である乳糖、マルトース、ラクツロースおよびマルツロースの還元により得られる化合物である。グリコシド基は、好ましくはグルコシドまた

はガラクトシドであり、糖アルコールは好ましくはソルビトール（グルシトール）である。特に好適な炭水化物は、マルチトール（4-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O-β-D-ガラクトピラノシル-D-グルシトール）、イソマルツロース、パラチニット（palatinit）およびその構成異性体（GPS、α-D-グルコピラノシル-1→6-ソルビトールおよびGPM、α-D-グルコピラノシル-1→6-マンニトール）、イソマルツロース由来の糖アルコール（パラチノース（palatinose））（6-α-D-グルコピラノシル-マンニトール、および6-α-D-グルコピラノシル-ソルビトール）、ショ糖およびその糖アルコールである。

メイラード反応のインヒビターは、当該分野で公知の任意のものである。生物物質を薬物調製物とともに使用する時、選択されるインヒビターは生理学的に許容されるものである。インヒビターは、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を防止または実質的に防止するのに十分な量で存在する。典型的にはアミノ基は、生物物質上に存在し、カルボニル基は炭水化物上に存在する。しかし、アミノ基とカルボニル基は、生物物質または炭水化物のいずれかの同じ分子内にあってもよい。種々のクラスの化合物が、メイラード反応に阻害作用を及ぼすことが知られており、従って本発明の組成物に有用である。これらの化合物は一般的に、競

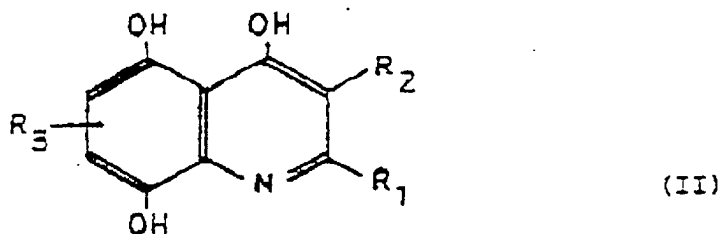
合的インヒビターであるかまたは非競合的インヒビターである。競合的インヒビターには、アミノ酸残基（D型とL型の両方）、アミノ酸残基とペプチドの組合せがあるが、これらに限定されない。特に好適なものは、リジン、アルギニン、ヒスチジン、およびトリプトファンである。リジンとアルギニンが最も有効である。多くの非競合的インヒビターが知られている。これらには、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンBなどがあるが、これらに限定されない。EP-A-O 433679号は、以下の式の4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体を記載している。

(a) 式(I)の4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体またはその塩：



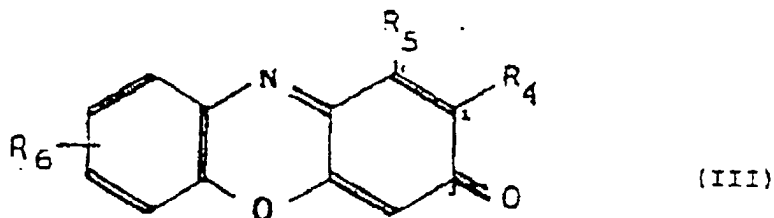
(式中、 R_1 と R_2 は、それぞれ水素、メチル、トリフルオロメチル、カルボキシ、メトキシカルボニルまたはエトキシカルボニルであり、 R_3 は水素またはヒドロキシである)；

(b) 式(II)の4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体またはその塩：



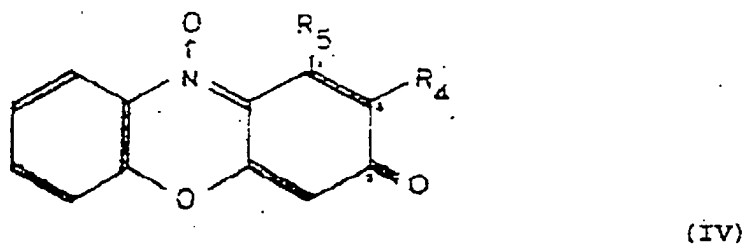
(式中、 R_1 、 R_2 および R_3 は前記で定義したものである)；

(c) 式(III)の3-オキソフェノキサジン誘導体またはその塩：



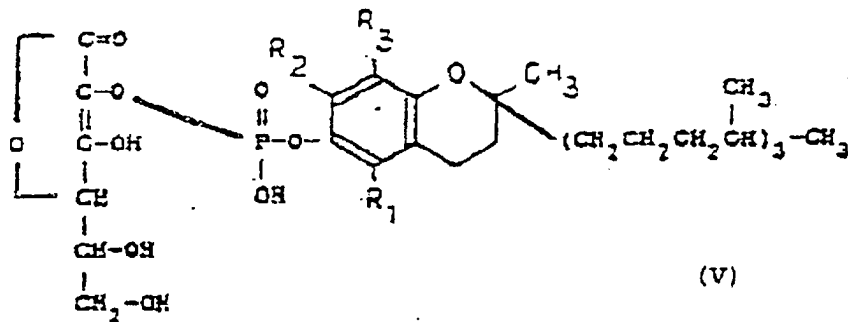
(式中、 R_4 と R_5 は、それぞれ水素であるか、または C_1 と C_2 を取り込んで、ヒドロキシル基および／またはカルボキシル基で随時置換された縮合〔2, 1-b〕ピリジン環を形成し、 R_6 は水素もしくはヒドロキシである) ; または

(d) 式 (IV) の 3-オキソフェノキサジン N-オキシドまたはその塩 :



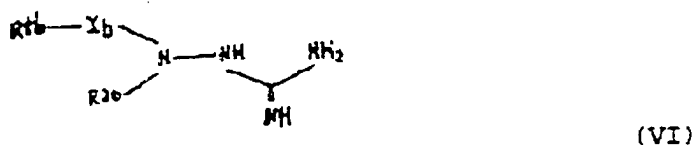
(式中、 R_4 、 R_5 および R_6 は前記で定義したものである)。

EP-A-O 430045号は同様に、メイラード反応阻害作用を有するアスコルビン酸トコフェリルホスフェートジエステル、すなわち式 :



(式中、 R_1 、 R_2 および R_3 は互いに独立であり、水素またはメチルである) の化合物、またはその塩を開示している。

またEP-A-O 325936号は、一般式 :



(式中、 R^{1b} は、ハロゲン原子、1～4個の炭素原子を有するアルキルまたはアルコキシ基、ニトロ基、フェノキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、および2～4個の炭素原子を有するアシルアミノ基よりなる群から選択される1～3個の基により置換されているかまたは置換されていない、炭素環または複素環であり、 X_b は一重結合、1～4個の炭素原子を有するアルキレン基、または2～4個の炭素原子を有するアルケニレン基であり、 R^{1b} は X_b と一緒に、1～4個の炭素原子を有するアルキル基であり、 R^{2b} は、水素原子、1～4個の炭素原子を有するアルキル基、またはハロゲン原子、1～14個の炭素原子を有するアルキルもしくはアルコキシ基、ヒドロキシ基およびニトロ基から選択される1～3個の基により置換されているかまたは置換されていないフェニル基である)のアミノグアニジン

ン誘導体、またはその酸付加塩を記載している。

1つの好適な態様において、乾燥の方法は凍結乾燥であり、メイラード反応インヒビターは競合的インヒビターである。別の好適な態様において、乾燥の方法は凍結乾燥であり、メイラード反応インヒビターは非競合的インヒビターである。さらに別の好適な態様において、乾燥は周囲温度または高温で行われ、メイラード反応インヒビターは競合的インヒビターである。さらに別の好適な態様において、乾燥は周囲温度または高温で行われ、メイラード反応インヒビターは非競合的インヒビターである。

本発明はまた、高温で保存される乾燥された生物物質の「寿命」または保存安定性を向上させる方法を包含する。保存安定性の向上は、加速エージング試験における生物活性の回復により測定される。この方法は、生物物質を安定化するのに十分な量の少なくとも1つの炭水化物賦形剤と、メイラード反応の少なくとも1つのインヒビターの存在下で、少なくとも1つの生物物質を乾燥または取り込むことよりなる。他の適当な緩衝液、塩、補助因子などを、組成物に加えることができる。組成物は任意の適当な温度で保存される。好ましくは、組成物は0℃～80℃の温度で保存される。より好ましくは、組成物は0℃～60℃の温度で保存される。最も好ましくは、組成物は周囲温度で保存される。

本発明はまた、生物物質、乾燥された生物物質を安定化するのに十分な量の炭水化物、およびメイラード反応のインヒビターよりなる、保存安定性の向上した組成物を包含し、ここで炭水化物は、乾燥時に生物物質を安定化するのに十分な量で存在し、インヒビターは、生物物質のアミノ基と、生物物質内のまたは炭水化物安定化賦形剤中のまたはそこから発生する反応性カルボニル基との縮合を実質的に防止するのに十分な量で存在する。好ましくは組成物は、 $0^{\circ}\text{C}\sim 250^{\circ}\text{C}$ で向上した保存安定性を有する。より好ましくは組成物は、 $20^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ で向上した保存安定性を有する。最も好ましくは組成物は、周囲温度より高い温度で向上した保存安定性を有する。

好ましくは組成物は、保存中のメイラード反応を低下させることにより分子の安定化が向上するように、ほとんど完全に乾燥している。ある程度の水分または他の水性溶媒が組成物中に残存してもよいが、好ましくは20%以下である。本

明細書において、「乾燥」、「乾燥した」および「実質的に乾燥した」とは、約0~20%の水を含有する組成物を包含する。好ましくは20%未満の水が存在し、より好ましくは10%未満の水が存在し、最も好ましくは約5%未満の水が存在する。

組成物は、前述の任意の方法により得られ、前述の任意の成分を含有する。組成物の種々の成分の実際の重量や割合は示していないが、本明細書の開示内容から不要な実験をすることなくこれらを決定するのは当業者の技術の範囲内である。

例1

生体分子のトレハロース安定化

トレハロースの存在下で空気乾燥した抗体は、傷害を受けず、室温または 37°C で数年保存した後も再水和すると完全な生物活性を回復することは、すでに証明されている。ローザー (Roser) (1991) ; ブレークリー (Blakely) ら (1990) ; およびコラコ (Colaco) ら (1990)。同様の結果が、種々の酵素、ホルモンおよび血液凝固因子について得られており、この方法は生物物質に一般的に適用できることを示唆している。ローザー (Roser) (1991) ; ローザーとコラコ (Roser and Colaco) ; ブレークリー (Blakely) ら (1990)

); コラコ (Colaco) ら (1990); およびコラコ (Colaco) ら (1992)。不安定な生物物質を保存するこの方法の厳しい試験として、分子生物学で使用されている酵素 (これは、不安定であることで有名であり、従って通常 -20°C 以下で輸送または保存されている) を詳細に検討した。制限エンドヌクレアーゼおよびDNA修飾酵素の両方とも、活性を失うことなく周囲温度でトレハロース溶液から乾燥することができることがすでに証明されている。さらに、これらの乾燥した酵素は、高温で長期間保存しても安定性を示す。コラコ (Colaco) ら (1992)。

トレハロース以外の炭水化物についてタンパク質の活性を保存する能力を試験するために、制限酵素 *Pst* I を用いて、種々の炭水化物賦形剤の残存水分含量が2.6~3.6%になるまで補助的に加熱して真空乾燥し、 37°C 、 55°C 、または 70°C で1カ月保存して、加速エイジング試験を行なった。

得られた結果を、表1と図1に示す。バクテリオファージλ DNAを切断する

能力について、種々の炭水化物賦形剤を用いて乾燥し、 37°C (図1、上のパネル)、 55°C (図1、真ん中のパネル)、および 70°C (図1、下のパネル) で35日間保存した酵素の、2.5単位 (図1、偶数番号のトラック)、または5単位 (図1、奇数番号のトラック) を、5単位の新鮮な酵素対照 (トラック1) と比較した。使用した炭水化物賦形剤は、グルコピラノシルーマンニトール (図1、トラック3と4)、またはソルビトール (図1、トラック5と6)、還元イソマルトース (図1、トラック7と8)、ショ糖 (図1、トラック9と10)、マルトース (図1、トラック11と12) およびトレハロース (図1、トラック13と14) である。図1から明らかなように、試験した2つの高温度でトレハロースのみが安定化作用を示す。

炭水化物賦形剤のいくつかは 37°C での乾燥と保存 (図1、上のパネル、表1) で酵素を安定化させたが、 55°C または 70°C (図1、真ん中のパネルと下のパネル、表1) ではトレハロースを用いて安定化した試料のみが活性を保持した。これらの結果は、リアルタイムのデータと相関付けられており、長期の安定性に関して、トレハロースは、同様の乾燥および保存条件下で試験した他の炭水化

物より優れた安定化賦形剤であるという知見を強調している（表1）。単糖類は還元糖も非還元糖もすべて無効であり、インスリン、フィコールおよびデキストランのようなポリマーも無効であった（表1）。還元糖（例えば、乳糖およびマルトース）は、試験した最も低い温度（37℃）でも1カ月以内に無効になり、非還元性二糖類も同様であった（表1）。化学的により安定な非還元糖である糖アルコールは、対応する還元糖より優れた安定性を示したが、55℃では1カ月以内に無効になった（表1）。

表1: 種々の炭水化物賦形剤中で乾燥したPST Iの安定性

炭水化物	化学名	赤色糖	温度 ℃	時間 日	活性
単糖類およびアルコール グルコース	α -D-グルコピラノース	+	37℃	1	+
			"	14	-
		-	"	14	+
			"	35	+
ソルビトール	グルコースの糖アルコール		"	70	-
		+	"	1	-
		-	"	1	-
		+	"	1	-
ガラクトース ガラクサトール マンノース マンニトール	β -D-ガラクトピラノース	+	"	1	-
	ガラクトースの糖アルコール	-	"	1	-
	α -D-マンノピラノース	+	"	1	-
	マンノースの糖アルコール	-	"	1	-
二糖類 トレハロース	α -D-グルコピラノシル- α -D-グルコピラノシド	-	"	98	++
			55℃	70	++
マルトース			70℃	35	+++
	4-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコース	+	"	14	++
			"	7	-

表 1 (続き)

炭水化物	化学名	赤色糖	温度 ℃	時間 日	活性
マルトトリオース	O- α -D-グルコピラノシル (1 \rightarrow 4) -O- α D- グルコピラノシル- (1 \rightarrow 4) -D-グルコース	+	"	14	-
乳糖	4-O- β -D-ガラクトピラノシル-D-グルコピラノース	+	"	14	-
ラクツロース	4-O- β -D-ガラクトピラノシル-D-フルクトース	+	"	14	+
シヨ糖	β -D-フルクトフラノシル- α -D-グルコピラノシド	-	37℃ "	35 14 35	- ++ -
ポリマー イヌリン	1-O- β -D-フルクトフラノシル-D- フルクトースのポリマー	-	"	7	-
デキストラン	α - (1 \rightarrow 6) -D-グルコピラノース (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4分岐) のポリマー	+	"	7	-
フィコール	β -D-フルクトフラノシル- α -D- グルコピラノースのポリマー	-	"	7	+

(27)

特表平 10-505591

活性の定量
 一検出可能な活性なし
 +いくらかの活性 (力価の 10~20%)
 ++部分的活性 (力価の 25~40%)
 +++完全な活性

還元性
 +還元糖
 -非還元糖

保存中の乾燥調製物の非酵素的褐色化

トレハロースの相対的な化学的安定性と非還元性は、その作用機序（特に高温で観察された長期安定性に関して）の重要な特徴であるようである。これはまず、前述の図1に記載の加速エージング試験で観察された驚くべき特徴により示唆された。図2に示すように、非酵素的褐色化は、37℃（上のパネル）、55℃（真ん中のパネル）、または70℃（下のパネル）で2週間保存した後の、図1で報告した加速エージング試験で使用した試料で観察された。使用した炭水化物賦形剤は、トレハロース（列1）、ショ糖（列2）、マルトース（列3）、還元イソマルトース（列4）、グルコピラノシルーソルビトール（列5）、およびグルコピラノシルーマンニトール（列6）である。

得られた結果は、試料のたった2週間の保存ですべての3つの温度で多くの試料のウェルで褐色に着色したことを示す。さらに、着色の程度は、これらの試料中の酵素活性の低下と相関するようである。高温で保存した試料では着色の増加が観察され（図2）、これはまた最大の活性の喪失を示した（図1）。この着色は、食品の加工と保存中に見られる非酵素的褐色化によく似ている。この非酵素的褐色化は、還元糖とこれらの食品の天然の成分であるタンパク質との自発的な反応の結果であり、いわゆるメイラード反応として食品化学で広く研究されてきている。

例3

乾燥調製物中のメイラード反応の証拠

制限酵素についての加速エージング試験で観察された（図2）褐色色素の出現を、生物活性の変化と相関させるために試験を行なった。これらの試験は、乾燥した酵素アルカリ性ホスファターゼの試料について、前記例1に記載の条件下で、グルコース、フルクトース、マルトースまたはトレハロースを含有する溶液から乾燥し、55℃で種々の期間保存した後、酵素活性を再測定して行なった。残存活性を、種々の炭水化物賦形剤の存在下で乾燥したアルカリ性ホスファターゼの試料で測定し、55℃で保存後に熱量計で測定した。

277～290 nmの吸光度で測定した褐色の着色の出現を、フルクトースとグ

ルコース中で乾燥し55℃で保存したアルカリ性ホスファターゼの試料の酵素活性の低下と比較した。得られた結果を図5に示すが、ここで着色はO. D. 277~290で測定した；(・) グルコース、(+) フルクトース。酵素活性(O. D. 405)は以下のように記載した：(*) グルコース、(□) フルクトース。メラノイド色素の産生は、熱量計で測定した界面活性剤の喪失の後に起きた(図4)。これは、褐色メラノイド色素の産生は、メイラード反応の最終段階で起きるという知見と一致し、従ってカスケードの初期の反応のため酵素不活性化を予測するために使用することはできない(図3)。同様に、SDS-PAGEによる試料の解析は、トレハロースで乾燥したもの以外のすべての試料についてタンパク質の破壊と架橋の複雑なパターンを示し、メイラード反応によるタンパク質修飾の程度を測定するこの技術が使用できないことを示している。

前述の試験で試料の残存糖含量の解析について、驚くべき結果が得られた。グルコースまたはフルクトース中で乾燥すると、乾燥直後の試料に個々の糖のみが検出された。しかし、高温保存で酵素活性が喪失すると、これらの試料は2つの糖の混合物を含有することが見いだされた。これらの結果を表2に示す。

マルトースの部分的加水分解のために、乾燥直後のグルコースとマルトースの混合物を含有することが見いだされた試料中で、同様の異性体化が観察された。高温保存で活性が喪失すると、これらの試料はマルトースと同様にグルコースとフルクトースの両方を含有することが見いだされた(表2)。この非酵素的異性体化で検出されたマンノース産生の欠如は、フィッシャー(Fisher)反応中のオサゾンの形成に類似の、共通のシッフ塩基中間体が関与する化学的経路であることを示している。

表 2：種々の賦形剤中で乾燥した調製物中の炭水化物のHPLC分析

2つの調製物に使用した炭水化物賦形剤	乾燥後の活性	乾燥後の糖分析	2週間後の活性	2週間保存後のHPLC分析
1. グルコース試料A	+	グルコース	-	グルコース+フルクトース
2. グルコース試料B	+	グルコース	-	グルコース+フルクトース
3. ソルビトール試料A	++	ソルビトール	-	ソルビトール
4. ソルビトール試料B	++	ソルビトール	-	ソルビトール
5. フルクトース試料A	+	フルクトース	-	フルクトース+グルコース
6. フルクトース試料B	+	フルクトース	-	フルクトース+グルコース
7. マルトース試料A	+++	マルトース+グルコース	-	マルトース+グルコース+フルクトース
8. マルトース試料B	+++	マルトース	+/-	マルトース+グルコース+フルクトース
9. ショ糖試料A	++++	ショ糖	++	「その他」
10. ショ糖試料B	++++	ショ糖	++	ショ糖
11. トレハロース試料A	++++	トレハロース	++++	トレハロース
12. トレハロース試料B	++++	トレハロース	++++	トレハロース

例 4

グルカゴンのメイラード反応関連修飾

炭水化物賦形剤によるタンパク質のこれらの化学的修飾の一般性を例示するために、関連する薬学的モデル系を試験した。30ミリTorrの真空中で25～42℃に保存温度を上昇させて18時間乾燥した、治療用ペプチドであるグルカゴンのタンパク質修飾を試験した。種々の炭水化物賦形剤を含有する調製物を、逆相高速液体クロマトグラフィーで解析した。種々の時間保存したグルコースとショ糖の比較から得られた結果を、図5に示す。

図5に示す結果は、98%以上の未処理グルカゴンは、保持時間約20分で単一のモノマーとして移動することを示す(図5A)。グルコース中で乾燥直後に、モノマーピークのすぐ前を移動する糖化グルカゴンの(影をつけた)単一ピークがある(図5B)。グルコース中で60℃で4日以内に、グルカゴンの大部分は、糖化と架橋により破壊された(影をつけた、図5C)。ショ糖中で2週間保存後、糖化グルカゴンのピークは主モノマーピーク(影をつけた、図5D)のすぐ前を移動するが、乾燥後の試料にはこのようなピークは現れなかった。

これらの結果は、グルコース(還元糖)の場合、乾燥中にシッフ塩基が形成されるが、ショ糖(非還元糖)の場合は、保存中にシッフ塩基が形成される。非還元糖としてショ糖は、乾燥中も保存中もシッフ塩基を形成しないと予測されていた。これは、還元糖と非還元糖の両方でメイラード反応が起き、従って本発明は還元糖と非還元糖の両方で使用するのに適している。これらの結果はさらに、賦形剤としてのショ糖の場合、保存されている物質により触媒される加水分解により還元糖が生成することを示す。さらに、産生される還元糖によるシッフ塩基形成は水を放出し、これは系を可塑化するのみでなく、加水分解反応とメイラード反応のカスケードの両方を直接加速する(例5、下記)。すなわち、ここで示した結果を考慮すると、メイラード反応のインヒビターは、生物物質の乾燥保存中に非還元糖とともに使用すると特に有用である。

例5

保存安定性におよぼす水の影響

化学的反応性への残存水の影響を直接調べるために、2つの非還元性賦形剤であるトレハロースとソルビトールとともにリジンを含むモデル系を、3つの

異なる規定された残存水含量で乾燥し保存して、使用した。化学的反応性は、乾燥混合物に5%量のグルコースを添加して、リジンとのその反応を50℃で保存後に残存するグルコースを定量することにより測定して確認した。

図6に得られた結果を示すが、85%のトレハロース水溶液(a)と85%のソルビトール水溶液(b)中の10%w/vのリジンと5%のグルコースを、-50℃で48時間の一次乾燥と20℃で24時間の2次乾燥により凍結乾燥した。無水P₂O₅上で20℃で保存した後、飽和水蒸気雰囲気にて0時間、8時間、または25時間接触させて、目的の水含量を得た。試料の実際の最終水含量は、カーン(Kahn)微量天秤を用いて熱重量法により測定した。その結果を図6に示す：
a) (□) 4.59%の水、(◇) 15.0%の水、(×) 22.89%の水；
および、b) (□) 5.42%の水、(◇) 13.12%の水、(×) 23.62%の水。

得られた結果は、トレハロース試料では、残存水含量が低下するとともに化学的反応性は低下し、特に水含量約5%では反応性は全く見られないことを示している(図6a)。これに対して、ソルビトール試料では、化学的反応性は乾燥条件下で増強される(図6b)。この結果は、水の活性が制限的であっても系のこれらの反応は完了するため、乾燥品の保存中にメイラード型の反応が極端に重要であることを示す。

例6

メイラード反応の非競合的インヒビターの影響

還元糖を含有する溶液からウシ血清アルブミンを乾燥し、種々の濃度のメイラード反応インヒビターであるアミノグアニジンの存在下で、55℃で3週間インキュベートした。メイラード反応の程度を、褐色の形成を277~290nmで分光学的に測定することにより定量した。

得られた結果を表3に示す。

表3

糖	インヒビター候補	糖：インヒビター比	吸光度
---	----------	-----------	-----

(25mM)		(モルベース)	褐色の程度
グルコース	なし		0.709
グルコース	アミノグアニジン	3 : 1	0.603
グルコース	アミノグアニジン	2 : 1	0.205
グルコース	アミノグアニジン	1 : 1	0.212
グルコース	アミノグアニジン	1 : 2	0.211
グルコース	アミノグアニジン	1 : 3	0.154
なし	アミノグアニジン	1 : 3	0.186
フルクトース	なし		2.5
フルクトース	アミノグアニジン	1 : 3	0.173

得られた結果は、乾燥したタンパク質調製物にメイラード反応インヒビターを添加すると、高温での保存中の乾燥タンパク質の分解を防止できることを示す。

例7

メイラード反応の競合的インヒビターの影響

乾燥組成物の保存中のメイラード反応の作用を低下させる競合的インヒビターの作用を測定するために、以下の実験を行なった。結果を図7に示す。

炭水化物賦形剤としての15%のグルコースと、競合的メイラード反応インヒビターとして加えた0、7.5、15および25%のリジンのいずれかを含有する調製物から、アルカリ性ホスファターゼ(0.25mg/ml)を真空下(80ミクロン)で周囲温度で16時間乾燥した。試料を55℃で4日間保存し、10%ポリアクリルアミドゲルで流して、 α -ナフチル酸ホスフェートとファーストブルーBB(0.5mM $MgCl_2$ を含有する0.38Mトリス-塩酸(pH10.3)中、それぞれ1mg/mlおよび1.33mg/ml)を用いて酵素活性について染色して測定した(図7、それぞれトラック1~4)。流した対照は、水性緩衝液中の酵素と、トレハロース中で乾燥した酵素である(図7、それぞれレーン8、9)。グルコース+リジン試料では一部の活性しか回収されなかったが、リジンの添加量を増やすと回収される活性が増加した。グルコースを有するがリジンを添加していない試料では、酵素活性は回収されなかった。

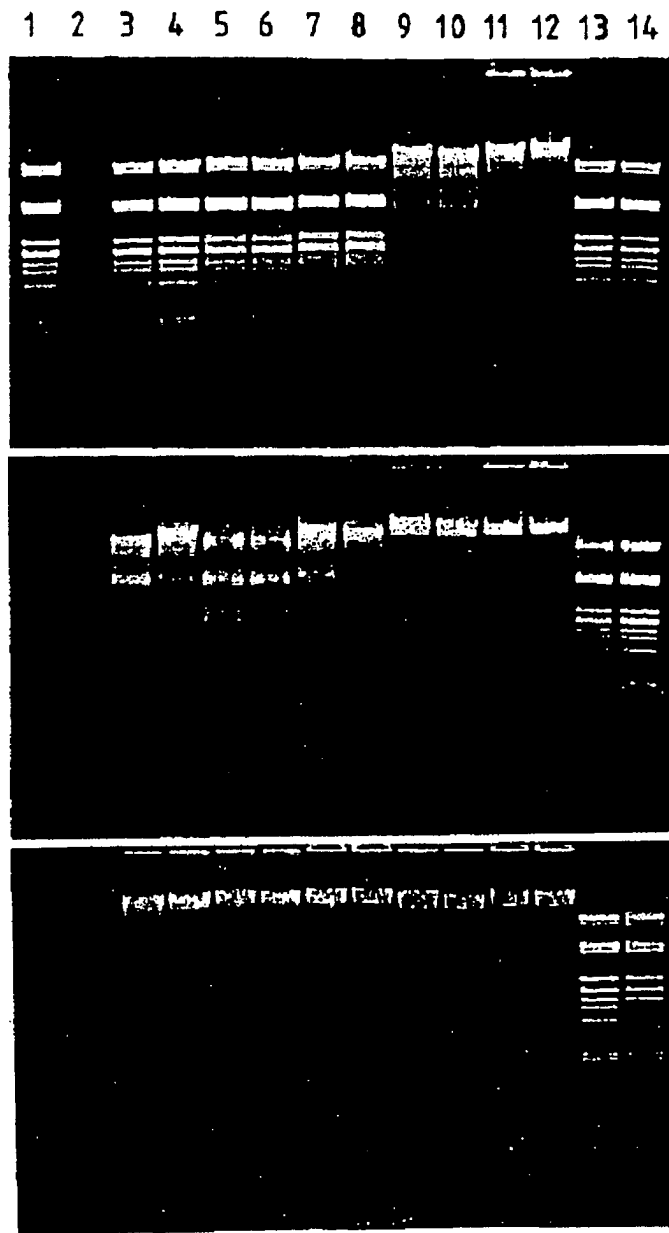
すなわち、メイラード反応の競合的インヒビターをタンパク質と炭水化物の混合物とともに乾燥すると、乾燥品の乾燥中と保存中のタンパク質の安定性を向上させる。

結論として我々の結果は、メイラード反応は、安定化賦形剤として炭水化物を含有する乾燥タンパク質調製物の長期保存安定性を決定するのにきわめて重要な要因であることを示唆する。理論に拘泥されるつもりはないが、これは乾燥中の水の除去によるシッフ塩基の生成に向かう初期のアミノカルボキシル基縮合反応の平衡の移動と、低い水活性での以後の反応の加速に起因するかも知れない。レンドルとシュライチャー (Lendl and Schleicher) (1990) およびヌルステン (Nursten) (1986)。

本発明を理解し易くするために説明と例によりあるていど詳細に記載したが、いくつかの変更や修飾が可能であることは当業者には明らかであろう。従って、本説明や例は本発明の範囲を限定するものではなく、本発明は添付の請求の範囲により限定されるものである。

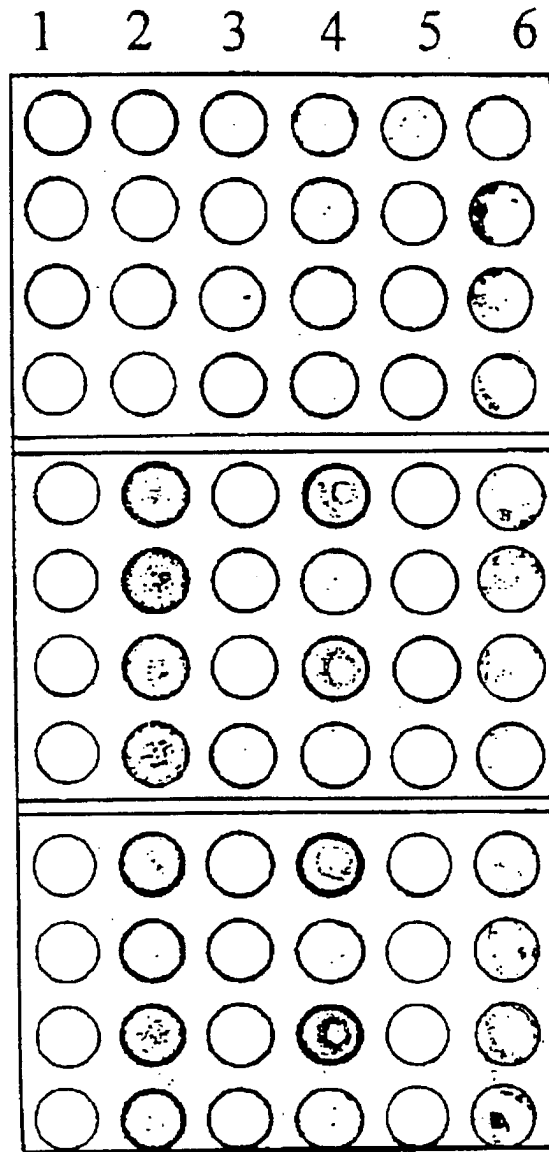
【図1】

FIG. 1



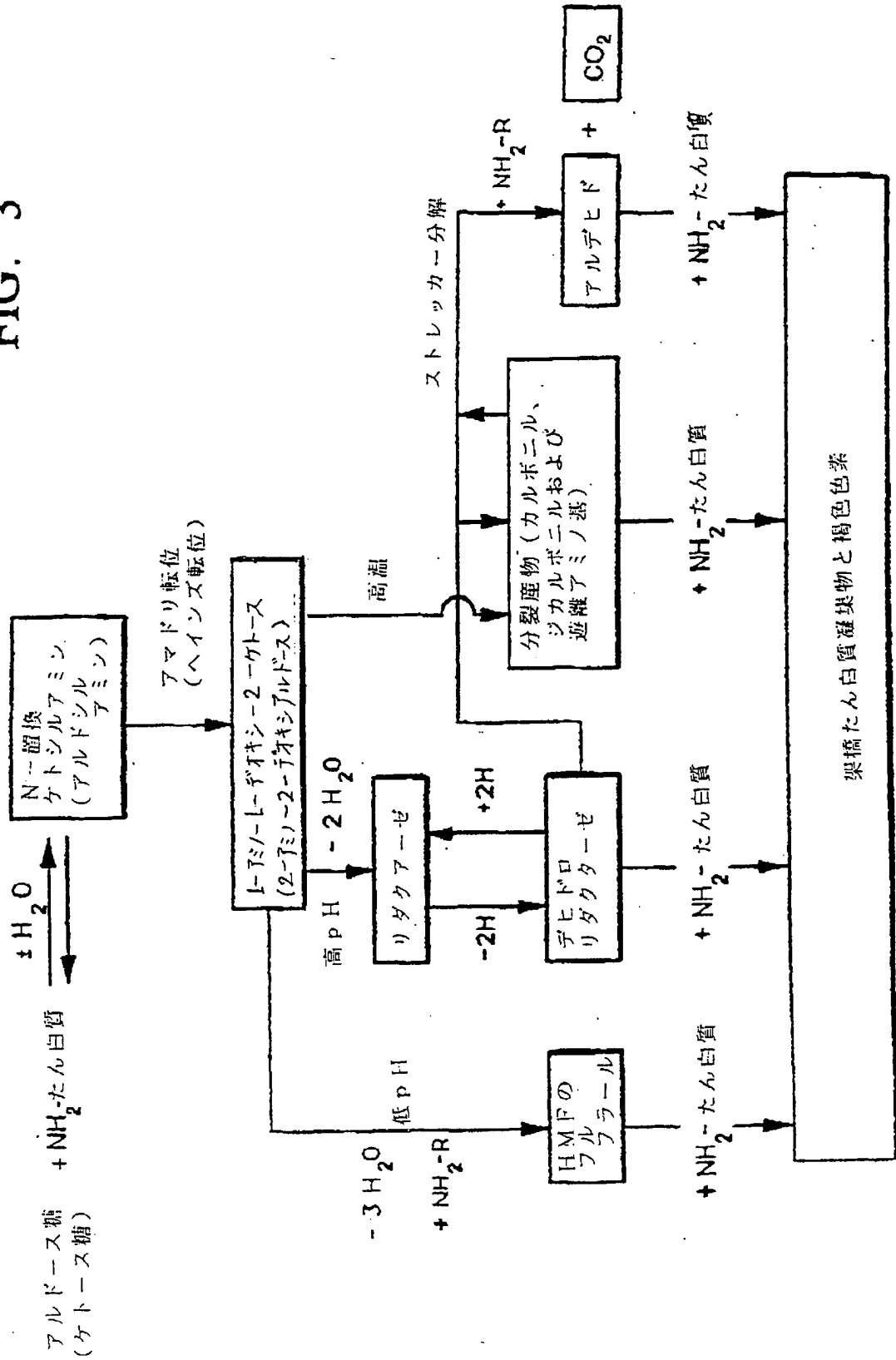
【図2】

FIG. 2



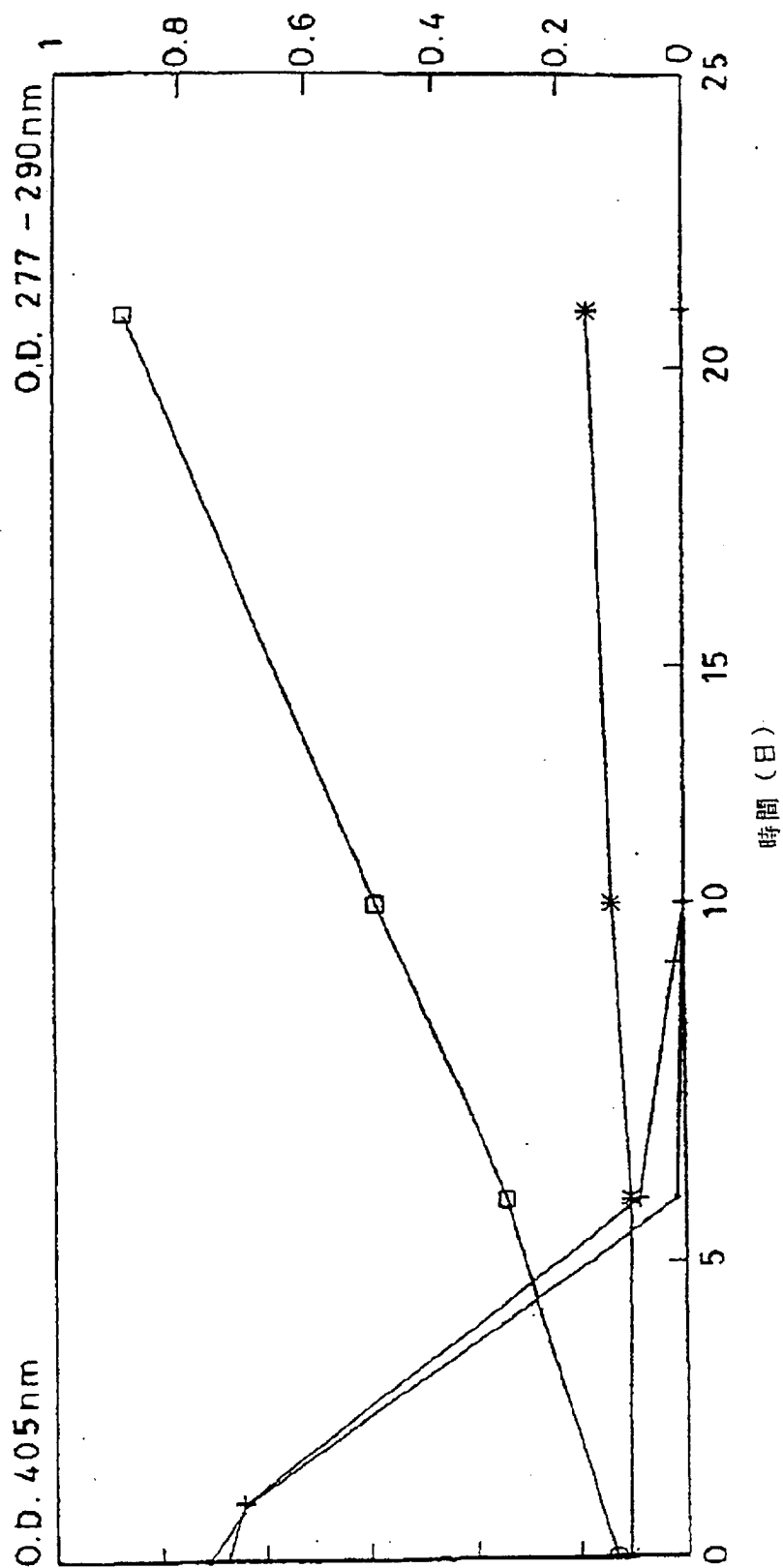
【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4



【图5】

FIG. 5A

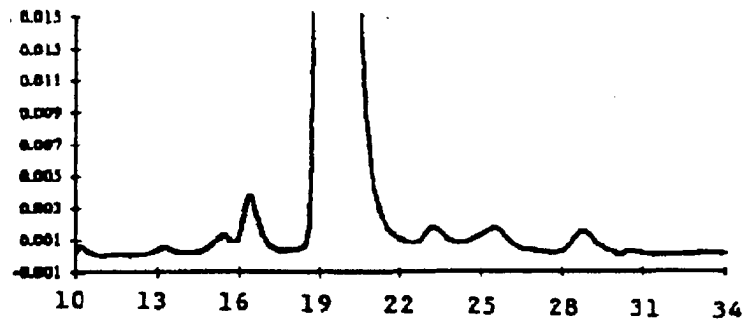


FIG. 5B

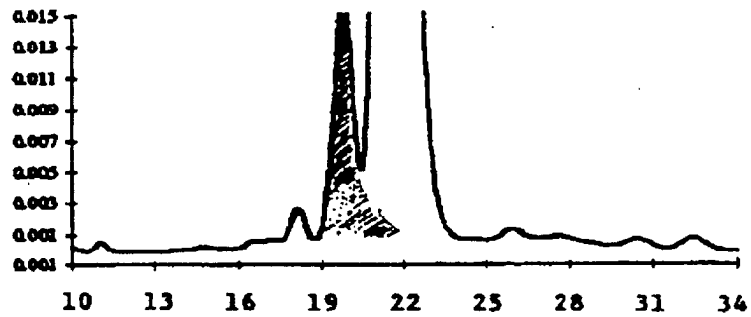


FIG. 5C

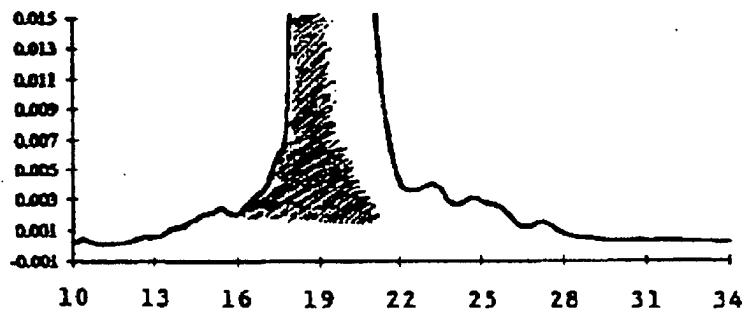
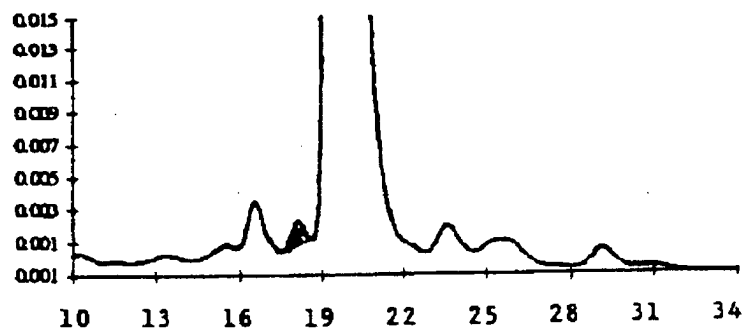


FIG. 5D



【図6】

FIG. 6a

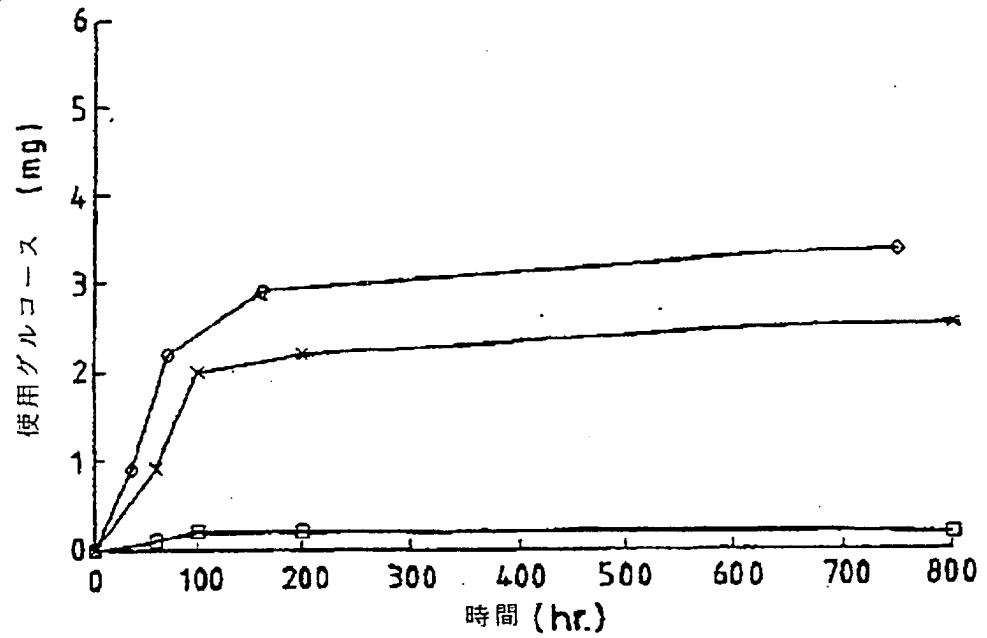
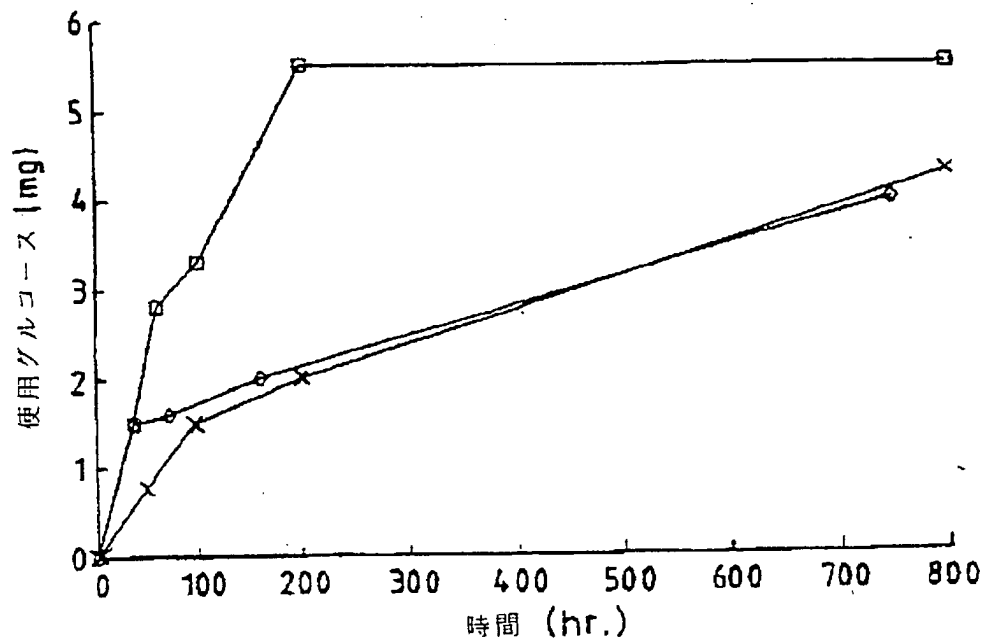
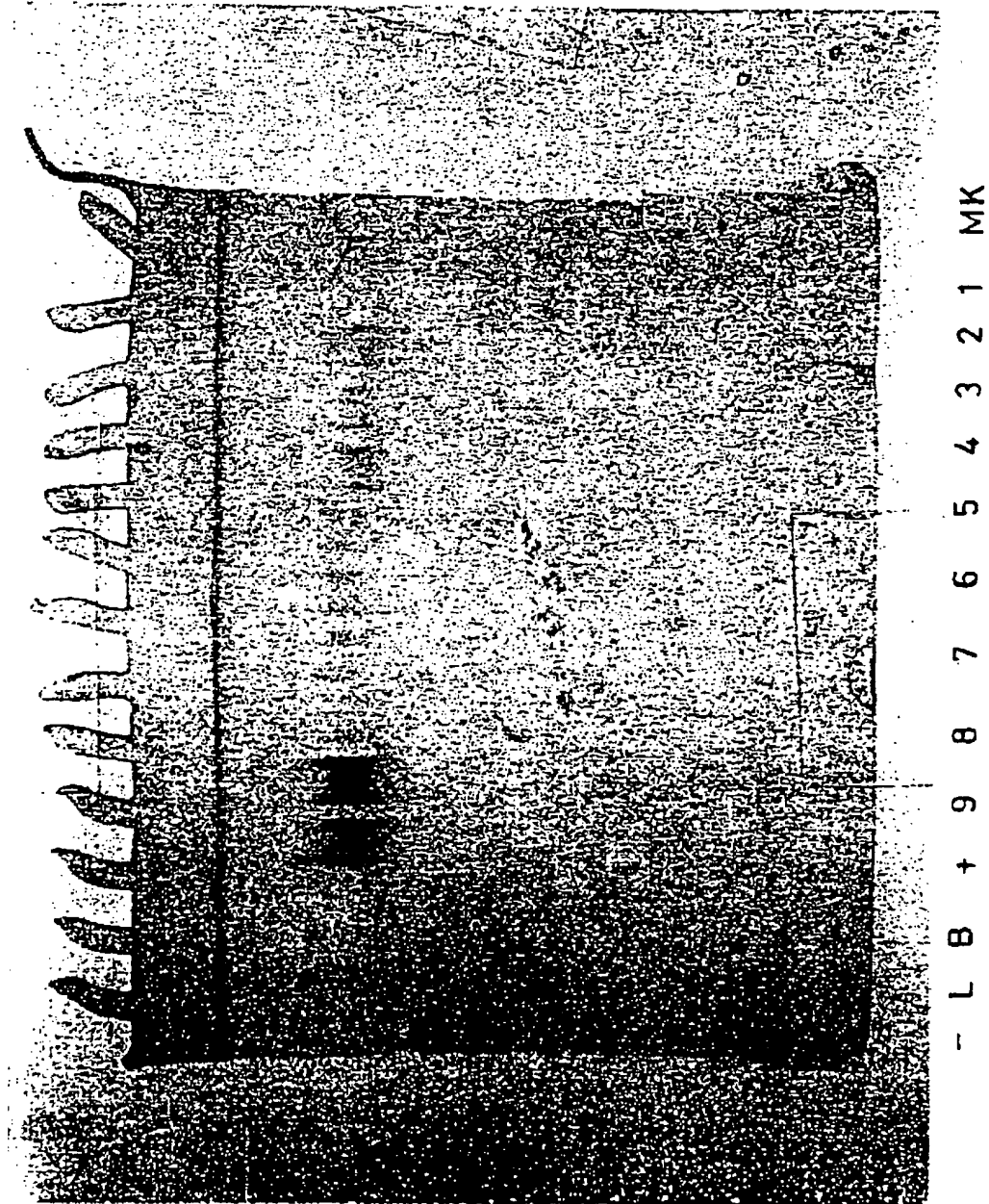


FIG. 6b



【図7】

FIG. 7



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1996年9月27日

【補正内容】

請求の範囲

1. 生物物質、生物物質の安定剤としての還元性または非還元性炭水化物、およびメイラード反応のインヒビターよりなる、安定化された乾燥組成物。
2. 生物物質は、細胞下成分、細胞およびウイルスから選択される、請求の範囲第1項に記載の組成物。
3. 生物物質は、遊離アミノ、イミノおよびグアニジノ側鎖を含有する分子から選択される、請求の範囲第1項に記載の組成物。
4. 生物物質は、薬剤、脂質、有機物、タンパク質、ペプチド、ホルモン、糖類、少糖類、合成ペプチド、DおよびLアミノ酸ポリマー、核酸、タンパク質核酸ハイブリッドおよび小分子から選択される、請求の範囲第3項に記載の組成物。
5. タンパク質は、酵素、生体薬物、成長ホルモン、増殖因子、モノクローナル抗体およびサイトカインから選択される、請求の範囲第4項に記載の組成物。
6. 乾燥の組成物は、凍結乾燥、噴霧乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、周囲温度かつ大気圧での乾燥、周囲温度かつ低圧での乾燥、高温かつ大気圧での乾燥、および高温かつ低圧での乾燥から選択される、請求の範囲第1項に記載の組成物。
7. 炭水化物は、二糖類、三糖類、少糖類およびこれらの糖アルコールよりなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の組成物。
8. 炭水化物は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元性配糖体から選択される、請求の範囲第7項に記載の組成物。
9. 炭水化物は、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストランおよび糖アルコールから選択される、請求の範囲第7項に記載の組成物。
10. 炭水化物は、グルコース、マルトース、乳糖、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースから選択される、請求の範囲第7項に記載の組成物。
11. 炭水化物は、マルチトール（4-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルシトール）、ラクチトール（4-O-β-D-ガラクトピラノシル-D-グル

シトール)、イソマルツロース、パラチニット (palatinit) およびその構成異性体 (GPS、 α -D-グルコピラノシル-1 \rightarrow 6-ソルビトールおよびGPM、 α -D-グルコピラノシル-1 \rightarrow 6-マンニトール)、イソマルツロース由来

の糖アルコール (パラチノース (palatinose)) (6- α -D-グルコピラノシル-マンニトール、および6- α -D-グルコピラノシル-ソルビトール)、シヨ糖およびその対応する糖アルコールから選択される、請求の範囲第7項に記載の組成物。

12. 炭水化物は生理学的に許容される、請求の範囲第7項に記載の組成物。

13. インヒビターは競合的である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

14. インヒビターは、少なくとも1つの1次、2次、または3次アミン基を有する分子である、請求の範囲第13項に記載の組成物。

15. インヒビターは、少なくとも1つのアミノ酸残基、アミノ酸残基の混合物、またはアミノ酸残基よりなる短いペプチドから選択される、請求の範囲第14項に記載の組成物。

16. インヒビターは非競合的である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

17. インヒビターは、アミノグアニジン誘導体、アンホテリシンB、4-ヒドロキシ-5, 8-ジオキソキノリン誘導体、4, 5, 8-トリヒドロキシキノリン誘導体、3-オキソフェノキサジン誘導体、3-オキソフェノキサジンN-オキシド、アスコルビン酸トコフェロールホスフェートジエステル、およびこれらの塩から選択される、請求の範囲第16項に記載の組成物。

18. 生物物質は0℃~80℃で保存安定である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

19. 生物物質は0℃~65℃で保存安定である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

20. 生物物質は10℃~60℃で保存安定である、請求の範囲第1項に記載の組成物。

21. 生物物質は20℃~50℃で保存安定である、請求の範囲第1項に記載の

組成物。

22. 還元性または非還元性炭水化物、およびメイラード反応のインヒビターよりなる、生物物質の保存安定性を向上させるための組成物。

23. 乾燥中の生物物質の安定性を向上させる方法であって、該物質、該物質を安定化するのに十分な量の還元性または非還元性炭水化物賦形剤、アミノ基と反

応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを組合せ、得られる組成物を乾燥することよりなる、上記方法。

24. 得られる組成物は、請求の範囲第2項～第21項までのいずれか1項で定義したものである、請求の範囲第23項に記載の方法。

25. 乾燥した生物物質の保存安定性を向上させる方法であって、該生物物質、該物質の安定性を向上させるのに有効な量の還元性または非還元性炭水化物賦形剤、アミノ基と反応性カルボニル基の縮合を実質的に防止するのに有効な量のメイラード反応のインヒビターを組合せ、組成物を保存することよりなる、上記方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No.
PCT/GB 95/01557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/14 A61K9/19 A61K47/26 A61K47/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 600 730 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 8 June 1994 see page 5, line 54 - page 6, line 9 see page 16, line 32 - line 44 ---	1-95
A	EP,A,0 090 356 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 5 October 1983 see page 1, line 1 - page 3, line 13 ---	1-95
A	US,A,4 371 557 (OPPY ET AL.) 1 February 1983 see the whole document ---	1-95
A	EP,A,0 222 313 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 20 May 1987 see page 2, line 2 - page 6, line 10 -----	1-95

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 1995

Date of mailing of the international search report

20.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 95/01967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-600730	08-06-94	JP-A- 6170221	21-06-94
		AU-B- 5203393	16-06-94
		CA-A- 2110331	03-06-94
		CN-A- 1094054	26-10-94
EP-A-90356	05-10-83	JP-C- 1583710	22-10-90
		JP-B- 2002916	19-01-90
		JP-A- 58164683	29-09-83
		US-A- 4547377	15-10-85
US-A-4371557	01-02-83	CA-A- 1160891	24-01-84
		JP-C- 1661445	19-05-92
		JP-B- 3023136	28-03-91
		JP-A- 57144946	07-09-82
EP-A-222313	20-05-87	US-A- 4758583	19-07-88
		AT-T- 112165	15-10-94
		AU-B- 610056	16-05-91
		AU-B- 6495886	21-05-87
		CA-A- 1294218	14-01-92
		DE-D- 3650080	03-11-94
		DE-T- 3650080	16-02-95
		ES-T- 2061435	16-12-94
		JP-A- 3103163	30-04-91
		JP-B- 6067827	31-08-94
		JP-A- 62142114	25-06-87
		US-A- 5316754	31-05-94
		US-A- 4908446	13-03-90
		US-A- 5468777	21-11-95
		US-A- 5175192	29-12-92
		US-A- 5140048	18-08-92
		US-A- 5106877	21-04-92
		US-A- 5114943	19-05-92
		US-A- 5258381	02-11-93
		US-A- 5218001	08-06-93
		US-A- 5202424	13-04-93
		US-A- 5238963	24-08-93
		US-A- 5254593	19-10-93
		US-A- 5221683	22-06-93
		US-A- 5334617	02-08-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 95/01957

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-222313		US-A- 5356895	18-10-94
		US-A- 5243071	07-09-93
		US-A- 5262152	16-11-93
		US-A- 5272176	21-12-93
		US-A- 5399560	21-03-95
		US-A- 5318982	07-06-94
		US-A- 5358960	25-10-94
		US-A- 5326779	05-07-94
		US-A- 5272165	21-12-93
<hr/>			

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/00		F 2 6 B 1/00	
7/00		A 6 1 K 9/14	D
F 2 6 B 1/00		C 1 2 N 5/00	Z

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, M K, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 ローザー, ブルース ジョセフ
イギリス国シービー3 9エルダブリュ
ケンブリッジ, バートン ロード, アーチ
ウェイ コート 4

(72) 発明者 セン, シェバンティ
イギリス国シービー3 9エルダブリュ
ケンブリッジ, バートン ロード, アーチ
ウェイ コート 4